

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-157586

(P2001-157586A)

(43) 公開日 平成13年6月12日 (2001.6.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ページ* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	
1/21		15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-342347

(22) 出願日 平成11年12月1日 (1999.12.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年6月4日  
日本農芸化学会東北支部発行の「日本農芸化学会東北支  
部第130回例会受賞記念講演シンポジウム講演要旨No.  
1 (1999)」に発表

(71) 出願人 390023793

岩手県

岩手県盛岡市内丸10番1号

(72) 発明者 佐藤 利次

岩手県北上市幸町2-30 ヒーロー和野  
202

(72) 発明者 平野 達也

愛知県名古屋市天白区原4-1103 むつみ  
ハイツ302号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロモーター遺伝子

(57) 【要約】

【解決手段】 以下の(a)又は(b)に示される、プロ  
モーターとして機能し得るDNAを提供する。(a) 配  
列番号1で表される塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1で表される塩基配列において少なくと  
も1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列  
を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【効果】 本発明により、シイタケチロシナーゼ遺伝子  
の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナ  
ーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、該プ  
ロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベ  
クター、該組換えベクターを含む形質転換体、並びに該  
形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法が提供され  
る。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示される、プロモーターとして機能し得るDNA。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項2】 請求項1記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項3】 以下の(c)又は(d)に示される、ターミネーターとして機能し得るDNA。

(c) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号2で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつターミネーター活性を有するDNA。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するDNA。

【請求項5】 請求項1若しくは2記載のDNA及び/又は請求項3若しくは4記載のDNAを含有する発現用組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載の発現用組換えベクターに任意のポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた組換えベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現用組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項8】 請求項6記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項9】 請求項8記載の形質転換体を培養又は栽培し、得られる培養物又は栽培物からポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、担子菌シイタケのチロシナーゼ遺伝子における転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、並びに該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年の組換えDNA技術の進歩により、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、糸状菌、動物細胞、植物細胞などの様々な細胞を宿主として用いる異種遺伝子発現用宿主ベクター系の開発が行われている。例えば、現在までに、大腸菌の宿主ベクター系を用いて、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロンなどの様々な有用物質が生産されている。また、植物の育種においては、従来の古典的な交配法では不可能であった種を越え

ての異種生物由来の遺伝子導入が、アグロバクテリウム・チウメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のTiプラスミドなどの宿主ベクター系を用いることにより行われ、所望の性質を有するトランスジェニック植物が作出されている。

【0003】上記の宿主ベクター系のうち、現在までに最も多く実用化されているのは大腸菌の宿主ベクター系である。しかし、大腸菌を宿主として用い、ヒトなどの高等動物由来のポリペプチドを生産させた場合、生産されたポリペプチドに糖鎖が付加されないことやポリペプチド鎖が本来の高次構造にフォールディング (folding) されないことなどが原因で、元来の生理活性を示さないことが多い。さらに、大腸菌は目的ポリペプチドの生産過程において、該ポリペプチド以外にも様々な毒性物質を産生するため、多段階の精製過程を必要とするなどの問題点がある。

【0004】そこで、それらの問題を解決するため、糖鎖付加機能及び適正なフォールディング機能を有する宿主として、酵母細胞や動物細胞などの真核細胞を用いる宿主ベクター系の開発が行われてきた。しかし、酵母細胞を用いてヒトなどの高等動物由来のポリペプチドを生産させた場合、ヒト由来のものとは異なる高マンノース型の糖鎖が付加される場合があること、あるいは目的ポリペプチドの生産が低いことなどの問題点が挙げられる。一方、動物細胞を用いた場合であっても、目的産物の収量が極めて少ないことや高価な培地を必要とすることなどの問題点が多い。そのような観点から、高等動物細胞と同等の糖鎖が付加されかつ安価に培養でき、そして安全性が高いなどの要件を満たす宿主ベクター系が求められていた。ところで、担子菌は一般に酵母よりも動物に近縁である [T. L. Smith : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7063 (1989)] ため、適正な糖鎖付加機能及び適正なフォールディング機能を有していると思われる。特に、シイタケ (*Lentinula edodes*) は、長年食用に用いられてきた実績もあり、安全性に優れている。

【0005】シイタケの属する食用担子菌の遺伝子工学的な処方による形質転換の技術開発は、これまで、Miranda D. らが、エレクトロポレーション法によるマッシュルームの形質転換 [Miranda D. van de Rhee, et. al., Mol. Gen. Genet., 250, 252-258, (1996)]、Ming Peng らがエレクトロポレーション法によるヒラタケの形質転換 [Peng, M., et. al., Curr. Genet., 22, 53-59, (1992)]、そして、Yanai, K. らがポリエチレングリコール法によるヒラタケの形質転換 [Yanai, K. et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475 (1996)] について報告し、Noël らがポリエチレングリコール法によるフミズキタケの形質転換 [Noël, T. and Labarere, J., Curr. Genet., 25: 432-437 (1994), Noël, T. et al., Theor. Appl. Genet., 90: 1019-1027 (1995)] について報告している。

【0006】シイタケの宿主ベクター系は有効なものが確立されていなかった。その理由のひとつとして、シイタケにおいて効率的に異種遺伝子を発現させ得る発現用組換えベクターが存在しないことが挙げられる。シイタケ宿主用発現用組換えベクターとしては、シイタケras遺伝子のプロモーター及びPriA遺伝子のターミネーターを利用したpLCベクター[Yanai et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, 1996、特開平6-319547、矢内ら、日本農芸化学会1995年度大会講演要旨集、p230]が報告されている。しかし、このベクターを用いてシイタケの形質転換を行った場合において、その形質転換効率はいわゆる低い(いずれもマイクログラムDNA当たり0.1個以下)ものであるため、汎用されるには至っていない。

【0007】一般に、より高い発現量をもたらす発現ベクターを構築するためには、mRNAへの転写効率が高いプロモーターを用いることが必要である。近年、我々は鋭意検討を重ね、有効なシイタケの形質転換方法及び発現ベクターを開発した(佐藤ら、特開平11-155568、平野ら、特願平10-247470)。

【0008】一方、ある特定の生育時期に特異的に発現させるプロモーターは、発現させる遺伝子によっては重要な因子になると考えられる。特に、子実体形成後に発現するプロモーターは、機能性タンパク質等の有用遺伝子産物を発現させる上で有効かつ重要であると考えられる。我々はすでにチロシナーゼ遺伝子(特開平10-174586)が、子実体形成後の後期に大量に発現していることを示唆する結果を得ている(Kanda, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 479-480, 1996、佐藤ら、日本農芸化学会1999年度大会講演要旨集、p214)。したがって、シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域は、特異的発現ベクターとして有用であると考えられる。しかし、現在までにシイタケ由来のチロシナーゼ遺伝子のプロモーター及び該プロモーターを含む組換えベクターは知られていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、シイタケのチロシナーゼ遺伝子の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、並びに該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、シイタケ菌糸から調製したcDNA及びゲノムDNAライブラリーからチロシナーゼ遺伝子を単離し、さらにそのプロモーター領域及びターミネーター領域を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)に示される、プロモーターとして機能し得るDNAを提供する。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。さらに、本発明は、上記DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNAを提供する。

【0012】さらに、本発明は、以下の(c)又は(d)に示される、ターミネーターとして機能し得るDNAを提供する。

(c) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号2で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつターミネーター活性を有するDNA。さらに、本発明は、上記DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するDNAを提供する。

【0013】さらに、本発明は、上記のプロモーターとして機能し得るDNA及び/又は上記のターミネーターとして機能し得るDNAを含有する発現用組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、上記発現用組換えベクターに任意のポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた組換えベクターを提供する。

【0014】さらに、本発明は、上記発現用組換えベクターを含む形質転換体を提供する。さらに、本発明は、上記組換えベクターを含む形質転換体、並びに、該形質転換体を培養又は栽培し、得られる培養物又は栽培物からポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

1. シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離

本発明のプロモーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子の5'上流域から単離したものであり、ターミネーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子の3'下流域から単離したものである。

【0016】本発明のプロモーター及びターミネーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子(特開平10-174586)cDNAの配列決定、シイタケゲノムDNAライブラリーの調製、該ライブラリーからのシイタケチロシナーゼ遺伝子ゲノムDNAの単離、該ゲノムDNAの配列決定、cDNAとゲノムDNAの配列比較によるプロモーター領域及びターミネーター領域の特定、並びにこれらの領域の単離という手順で得ることができる。以下、各工程について説明する。

【0017】(1) mRNAの調製及びcDNAの作製

シイタケ (*Lentinula edodes*) から mRNA を抽出する。mRNA の抽出は、公知の方法、例えばオリゴ (dT) セルロースカラム法、マグネタイトオリゴ (dT) パーティクル法、あるいは Novagen 社の Straight A's™ mRNA Isolation Kit を用いて行うことができる。mRNA の抽出に使用する組織としては、例えば子実体、菌糸等が挙げられる。

【0018】次に、これらの組織を凍結し、液体窒素存在下で磨砕し、RNA 抽出液を加えて全 RNA の粗抽出物を得る。さらに、タンパク質、多糖類、その他の不純物を除去し、マグネタイトオリゴ (dT) パーティクルを用いて更に精製する。ポリ A (ポリ A+) 鎖断分を溶出し、溶出液を集めた後、同様の精製を 2~3 回繰り返すことによって mRNA を高度に濃縮する。一方、シイタケチロシナーゼの部分アミノ酸配列から合成した 2 種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計する。

【0019】前記のように精製した mRNA をテンプレートにし、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いて RT-PCR を行い、得られたシイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列をクローニングした後、その塩基配列を解析する。塩基配列の解析は、例えば ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, FS (Perkin Elmer) を用いて行うことができる。RT-PCR 産物の塩基配列を基に、改めてシイタケチロシナーゼ遺伝子に特異的なプライマーを合成する。

【0020】上記プライマーを用いて RACE 法によりシイタケチロシナーゼ遺伝子の 5' 末端側及び 3' 末端側の部分塩基配列を増幅する。RACE 法は、例えば 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 及び 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Gibco BRL) を用いて行うことができる。

【0021】RACE 法によって増幅されたシイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列をプラスミドベクターに組み込んだ後、トランスフォーメーションすることによってクローニングする。RACE 産物のクローニングは、例えば Original TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いて行うことができる。

【0022】(2) プローブ DNA の作製  
シイタケから単離精製されたチロシナーゼの部分アミノ酸配列から 2 種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマー (N プライマー及び C プライマー) を合成する。

【0023】N プライマー: 5'-T(C/T)CA(A/G)AT(A/C/T)GG(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AT(A/C/T)CA(C/T)GG-3' (配列番号 6)

C プライマー: 5'-(A/G)(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TC(A/C/G/T)AC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(A/G)TG(A/G)TG-3' (配列番号 7)

【0024】この 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて RT-PCR を行い、得られる DNA 断片を精製した後、クローニング及びシーケンシングを行

う。得られた塩基配列を基に改めて 2 種類のプライマー (N>GL.SQ01 プライマー及び GL<C.SQ01 プライマー) を合成する。

【0025】N>GL.SQ01 プライマー: 5'-GCGCAGGAAATAAGCCAGTAGACAC-3' (配列番号 8)

GL<C.SQ01 プライマー: 5'-GCGTGGTGCATAAAGAAAAT-3' (配列番号 9)

【0026】上記 2 種類のプライマーを用いて得られる 650 bp の RT-PCR 産物を精製した後、クローニングする。クローニングは、例えば Original TA Cloning kit (Invitrogen) を用いて行うことができる。得られたクローンからプラスミド調製した後、Eco RI 消化によってインサート (RT-PCR 産物) を回収し、プローブとして用いる。

【0027】(3) RACE 産物からのスクリーニング  
クローニングした RACE 産物から、チロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列を有するクローンをスクリーニングする。スクリーニングは、例えば上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法、あるいは上記 2 種類のプライマーを用いた PCR 法によって行われる。

【0028】(4) RACE 産物のシーケンシング  
RACE 産物の塩基配列については、上記 (3) で得られたクローンからプラスミドを調製し、市販のキット ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer 社製) を用いて決定することができる。

【0029】配列番号 3 にチロシナーゼ遺伝子 cDNA を例示するが、本質的にチロシナーゼ活性を発現する配列であればこの配列に限定されるものではなく、欠失、置換、挿入、付加などによってその塩基配列を変異させることが可能である。

【0030】(5) シイタケのゲノム DNA 及びゲノム DNA ライブラリーの調製

ゲノム DNA の供給源は、上記 (1) と同様に、シイタケの傘、菌褶、菌輪、菌柄、脚苞、菌糸など子実体の一部でもよく、子実体全体でもよい。また、胞子又は一次菌糸若しくは二次菌糸を 0.25×MYPG 培地、SMY 培地、グルコース・ペプトン培地などの固体培地で培養後、菌糸を液体培地に接種し、生育した菌体を用いることができる。

【0031】ゲノム DNA の調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、液体培養したシイタケの菌体を浚過などにより集菌後、菌体を液体窒素で凍結し、凍結菌体を乳鉢を用いて磨砕する。磨砕した菌体に DNA 抽出用緩衝液を加え、クロロホルムを加え激しく攪拌する。クロロホルムを除去後、水層部分にエタノールを徐々に添加し、DNA が析出したところでゲノム DNA を巻取り、TE 緩衝液に溶解することにより、ゲノム DNA 溶液を得ることができる。あるいは、磨砕した菌体から、市販のキット (例えば ISOPLANT (ニッポンジ

ーン社製))を用いてゲノムDNAを得ることもできる。

【0032】ゲノムDNAライブラリーの作製は、ゲノムDNAを制限酵素Sau3AIなどの制限酵素で消化し、フェノール・クロロホルムで処理した後に、エタノール沈殿によりDNA断片を回収し、次いで市販のキット(例えば、Lambda EMBL3/Bam HI Vector Kit (Stratagene社製))を用い、該断片を、例えば入 EMBL3-Bam HI アームにT4 DNAリガーゼを用いて連結し、得られたファージDNAを大腸菌に感染させることにより作製することができる。

【0033】(6)ゲノムチロシナーゼ遺伝子の単離  
ゲノムチロシナーゼ遺伝子は、ゲノムDNAライブラリーから通常の方法(例えばPCR法、ブランクハイブリダイゼーション法等)によりスクリーニングすることができる。すなわち、上記チロシナーゼcDNA断片をプローブとして、シイタケゲノムDNAライブラリーからスクリーニングする方法等が挙げられる。

【0034】この断片をベルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどによる酵素直接標識又は<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>Sなどによる放射性標識後、プローブとして用い、これらをファージライブラリーのDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンフィルターとハイブリダイズさせる。そして得られたポジティブシグナルからファージクローンを同定し、シイタケのチロシナーゼ遺伝子をクローニングすることができる。

【0035】上記のようにして得られる陽性クローンの塩基配列は、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer社製)等の市販のキットを用いて決定することができる。PCR反応は該キットに添付のマニュアルにしたがって行い、得られたPCR産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer社製)等によって解析することができる。このようにして決定される全塩基配列としては、例えば配列番号5で表されるものを挙げることができる。この配列はチロシナーゼ遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列である。この配列と、配列番号3のチロシナーゼ遺伝子を含むcDNAの塩基配列の配列の比較から、解析したチロシナーゼ遺伝子は図1のように8つのイントロン(直線部分)を有する9つのエキソンに分断されて、ゲノム上に存在することがわかる。

【0036】(7)チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離  
チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離は、該領域をそれぞれ含むチロシナーゼ遺伝子上流約2.6kbpの領域及び下流約1kbpの領域を、上記(6)において決定された塩基配列に基づいて合成したプライマーを用いて、ゲノムライブラリーからクローニングしたゲノムチロシナーゼ遺伝子、シイタケ染色体DNAなどを鋳型としてPCRによって増幅する

ことにより行うことができる。ここで、プロモーター領域単離のためのPCRに用いることができるプライマーとして、例えば、5'-ATTCCAAGCCTGTATTCCTCCTATCG-3' (配列番号10)の塩基配列で表される5'センスプライマー(TproUプライマーともいう)及び5'-CTCTGTGAAAACAAATCGGTGTGTGGG-3' (配列番号11)の塩基配列で表される3'アンチセンスプライマー(TproLプライマーともいう)が挙げられる。また、ターミネーター領域単離のためのPCRに用いることができるプライマーとして、例えば、5'-GGAATTCGAATGAATATCGCGATAAATAAATAATGT-3' (配列番号12)の塩基配列で表される5'センスプライマー(TterUプライマーともいう)及び5'-AGCTTCGCCCCCTCTCTGCGCCCTTA-3' (配列番号13)の塩基配列で表される3'アンチセンスプライマー(TterLプライマーともいう)が挙げられる。

【0037】配列番号1に本発明のプロモーター活性を有するDNA断片の塩基配列、配列番号2に本発明のターミネーター活性を有するDNA断片の塩基配列を例示するが、前者の場合であればプロモーター活性、後者の場合であればターミネーター活性を有する限り、当該塩基配列において少なくとも1個の塩基の欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。ここで、欠失、置換、付加とは、1~10個の短い欠失、置換、付加のみならず、10~50塩基、さらには50~100塩基の長い欠失、置換、付加も含む。

【0038】また、上記プロモーター遺伝子又はターミネーター遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNAも本発明のプロモーター遺伝子又はターミネーター遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、10mM~300mM、好ましくは20~100mMであり、温度が25℃~70℃、好ましくは42℃~55℃での条件をいう。

【0039】なお、DNAに変異を導入するには、Kunkel法やGapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-KやMutant-G (TaKaRa社製))などを用いて、あるいはTaKaRa社のLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキットを用いて変異を導入することができる。

【0040】一旦、本発明のDNA断片の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本発明のDNA断片を含むcDNA若しくはゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のDNA断片を得ることができる。

【0041】2.本発明の発現用組換えベクターの構築  
本発明の発現用組換えベクターは、従来のシイタケ用発現ベクターと異なり、上記1.で得られるチロシナーゼ遺伝子プロモーター及び/又はチロシナーゼ遺伝子ター

ミネターを組み込んだ発現ベクターである。本発明の発現用組換えベクターは、上記プロモーター及び／又はターミネーターを適当なプラスミドベクター（例えば、pUC19ベクターなど）に連結することにより構築することができる。

【0042】発現用組換えベクターには、外来遺伝子の導入を実際に確認する上で有効なマーカー遺伝子を併用して使用することが望ましい。そのため本発明の発現用組換えベクターには、チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域の下流に、例えば抗生物質ハイグロマイシンBに対する抵抗性を付与するハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hph)遺伝子[Griz and Davis, Gene, 25: 179-188 (1983)]、除草剤ビアラフォスに対する抵抗性を付与するホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子[Murakami et al., Mol. Gen. Genet., 205: 42-50 (1986)]などを連結するとよい。こうして作出した発現用組換えベクターをPEG法、エレクトロポレーション法、REMI法などの様々な遺伝子導入法でシイタケに導入し、その薬剤に対する抵抗性を指標として形質転換体を得ることができる。

【0043】3. 本発明の発現用組換えベクターを用いるポリペプチドの生産

本発明の発現用組換えベクターを用いて、シイタケにおいて目的のポリペプチドを遺伝子工学的に得ることができる。

【0044】上記2.の発現用組換えベクターに、目的のポリペプチド、例えば、インシュリン、成長ホルモン、チロシナーゼ、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼなどの有用タンパク質等をコードする遺伝子を連結（挿入）することにより組換えベクターを作製することができる。本発明のベクターに目的のポリペプチドをコードする遺伝子を挿入する方法としては、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、本発明のベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが挙げられる。得られた組換えベクターをシイタケにPEG法、エレクトロポレーション法、REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法などの方法により導入することにより、形質転換体を得ることができる。

【0045】次いで、得られた形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより、目的のポリペプチドを得ることができる。

【0046】本発明において形質転換体の菌糸を培養する方法としては、シイタケの培養に用いられる通常の方法に従って行われる。シイタケを宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、シイタケが資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0047】炭素源としては、グルコース、フルクトー

ス、スクロース、デンプン、マルトース、デキストリン等の炭水化物が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機塩類若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、NZアミン等が用いられる。

【0048】無機物としては、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸亜鉛、塩化マンガ、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0049】菌糸の培養は、液体培地での振盪培養、通気攪拌培養、固体培地での静置培養等の好気〜微好気条件下、25℃で数日間〜2ヶ月程度行うことが好ましい。継代は生育した菌糸の一部を新たな培地に接種することにより行うことができる。培養中は、必要に応じてハイグロマイシンやビアラフォス等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0050】目的のポリペプチドがシイタケ子実体において生産される場合には、シイタケ菌株を用いて子実体を立ち上げることができる。シイタケ子実体を立ち上げる方法としては、例えば、菌床培養が挙げられる。

【0051】菌床培養を行うためには、まず、種菌を調製する。ここで、「種菌」とは、シイタケ栽培において種として使用するもので、適度な条件下で純粋に培養した菌体又は培養物をいう。このような種菌としては、液体培地にて調製した液体種菌、菌糸を断片化した液体種菌、寒天培地で調製したもの、オガクズ種菌等が挙げられる。

【0052】種菌の調製は、公知の方法を用いて行うことができ、その方法は特に制限されないが、ここでは1例としてオガクズ種菌培養法を用いた例を示す。培地は、オガクズと米ヌカとを10:1の割合で混合し、含水率63%に調製する。これをポリプロピレン製培養器(800ml)に500g充填し、蓋をして121℃で40分間加圧蒸気滅菌をする。室温まで放冷した後、シイタケ菌株を接種し培養する。培養の条件は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されない。このような培養は、例えば、20℃、相対湿度65%にて約50日間培養することにより行うことができる。

【0053】次に、上記のようにして得られる種菌を用いて、菌床培養を行う。ここで、「菌床」とは、シイタケの栽培を目的として調製された培地に種菌を接種したもの、又はその菌が蔓延したものをいう。この菌床培養は、当業者であれば適切に行うことができるため、その方法は特に制限されないが、1例として以下のような方法を挙げることができる。

【0054】オガクズ：北研バイデル(10:1)からなる培地の水分を63%に調整し、フィルター付きポリプロピレン製袋に、培地を2.5kg詰め込み、直方体(密



度0.7g/cm)に成形する。培地中央部に直径2cmの穴を底部に到達するまで開け、これをオートクレーブにて、121℃で40分間滅菌し、室温で一晩放冷したものを培養基とする。この培養基に上記オガクズ種菌を約17gずつ接種し、ヒートシーラーにて速やかに袋を閉じる。これを20℃、相対湿度65%の条件下において暗黒下で培養する。この培養は、菌糸が菌床全面に蔓延し、完熟するまで行うが、通常、種菌接種から菌床完熟までの期間は102～116日間である。

【0055】最後に、上記の菌床培養によって得られる菌床から子実体を発生させる。この操作は当業者であれば適切に行うことができるため、その方法は特に制限されないが、1例として以下のような方法を挙げることができる。

【0056】菌床完熟培養した袋を開封して菌床を取り出し、温度16℃、湿度85%、照度300ルクス(12時間おき)の条件下で子実体を発生させ、収穫する。子実体の芽出しから収穫までの期間を特に「発生期間」というが、この発生期間は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されない。発生終了後、浸水処理(約20時間)を施した後に、再度発生のための培養を行って2回目の発生を行う。さらに、収穫後、再度浸水処理を行い、2回目と同じく子実体の発生を行うことができる。

【0057】培養後、目的のポリペプチドが菌体内あるいは子実体内に生産される場合には菌体あるいは子実体を破碎する。一方、目的のポリペプチドが菌体外に分泌される場合には、液体培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体を除去し、上清を得る。そして、ポリペプチドの単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、上記培養物中から目的のポリペプチドを単離精製することができる。

【0058】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

【0059】〔実施例1〕シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離

(1)シイタケ菌糸の調製

北研産業(株)のシイタケ菌株北研57の2核菌糸を0.25×MYPG寒天培地(0.25%麦芽エキス、0.1%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.5%グルコース、1.5%寒天)に接種し、約2週間、25℃で培養した。生育した菌糸を寒天培地上からかきとり、100mlの0.25×MYPG液体培地の入った200ml容三角フラスコに接種した。接種後、25℃で約2～4週間振盪培養し、菌糸を生育させた。

【0060】(2)シイタケ子実体採取

子実体形成は松本ら(T. Matsumoto et al., Rept. Tottori Mycol. Inst., 26, 46-54 (1988))の方法に準じて行い、菌傘底部の被膜が切れ始めた状態の子実体を収穫し、25℃で3日間保存した褐変開始前の菌褶部から総RNAの抽出を行った。

【0061】(3)総RNAの抽出

試料から総RNAの抽出はISOGEN(Nippon Gene社)のプロトコールに準じて行った。その結果、試料1gから精製された総RNA 0.5mgを得た。

(4)mRNAの調製

RNA 0.5mgに対して、Straight A's™ mRNA Isolation Kit(Novagen社)を利用し、Anneal Magnetight™ Oligo(dT) Particleを用いたアフィニティー精製法を行うことによりmRNAを精製した。最終的に27μgのmRNAが精製された。

【0062】(5)cDNAの調製

mRNAからのcDNAの調製には、逆転写酵素として、SuperScript II™ RNaseH- Reverse Transcriptase(GibcoBRL)を用いた。反応は常法にしたがって42℃で60分反応し、95℃で10分加熱処理して反応を停止した。反応液からcDNAを常法にて精製単離した。

【0063】(6)シイタケチロシナーゼ遺伝子部分塩基配列の調製

シイタケチロシナーゼの部分アミノ酸配列(K. Kanda et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1273-1278 (1996))から2種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマー(Nプライマー及びCプライマー)を合成した。

【0064】Nプライマー: 5'-T(C/T)CA(A/G)AT(A/C/T)GG(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AT(A/C/T)CA(C/T)GG-3' (配列番号6)

Cプライマー: 5'-(A/G)(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TC(A/C/G/T)AC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(A/G)TG(A/G)TG-3' (配列番号7)

【0065】これら縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上記cDNAをテンプレートにしてPCRを行った。反応は、94℃で1分、50℃で1分、72℃で2分の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。得られた700 bpのRT-PCR産物は常法にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0066】(7)RT-PCR産物のシーケンシング

RT-PCR産物の塩基配列については、上記(6)で得られたクローンからRPM Kit(Bio101)でプラスミドを調製し、このプラスミドをテンプレートとしてABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS(Perkin Elmer)を用いたPrimer Walking法によってシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。この塩基配列から改めてシイタケチロシナーゼ遺伝子に特異的な2種類のプライマー(N>GL.SQ01プライマ

ー及びGL<C.SQ01プライマー)を合成した。

【0067】N>GL.SQ01プライマー: 5'-GCGCAGGAAATAAG  
CCAGTAGACAC-3' (配列番号8)

GL<C.SQ01プライマー: 5'-GCGTGGTGCATAAAGAAAT-3'  
(配列番号9)

【0068】(8) RACE法によるシイタケチロシナーゼ  
遺伝子の5'末端側の塩基配列の調製GL<C.SQ01プライ  
マーを用いて、5' RACE System for Rapid Amplificati  
on of cDNA Ends (GibcoBRL) を利用してシイタケチロシ  
ナーゼ遺伝子の5'末端側の塩基配列をキットのプロトコ  
ールにしたがって増幅した。得られた5' RACE産物は常法  
にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0069】(9) RACE法によるシイタケチロシナーゼ  
遺伝子の3'末端側の塩基配列の調製N>GL.SQ01 プライ  
マーを用いて、3' RACE System for Rapid Amplification  
of cDNA Ends (GibcoBRL) を利用してシイタケチロシ  
ナーゼ遺伝子の3'末端側の塩基配列をキットのプロトコ  
ールにしたがって増幅した。得られた3' RACE産物は常法  
にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0070】(10) プロブDNAの調製  
前記(4)で調製したcDNAをテンプレートにし、前  
記(7)で合成した2種類のプライマー(N>GL.SQ01プ  
ライマー及びGL<C.SQ01プライマー)を用いてPCRを  
行った。反応は、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で1分  
の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。得  
られた650 bpのPCR産物を常法にしたがって精製した  
後、クローニングを行った。得られたクローンからブラ  
スミドを調製した後、Eco RI消化によってインサートを  
回収し、プロブDNAとした。

【0071】(11) シイタケチロシナーゼ遺伝子の部  
分塩基配列を有するRACE産物のスクリーニング  
前記(8)及び(9)で作製したRACE産物を有するクロ  
ーンから、前記(10)で調製したプロブを用い、コロ  
ニーハイブリダイゼーション法でシイタケチロシナー  
ゼ遺伝子の部分塩基配列を有するクローンをスクリー  
ニングした。

【0072】(12) シイタケチロシナーゼ遺伝子部分  
塩基配列を有するRACE産物のシークエンシング  
RACE産物の塩基配列については、前記(7)の方法に  
したがって解析した。5' RACE産物及び3' RACE産物は、と  
もに前記(10)で得られたシイタケチロシナーゼ遺伝子  
に特異的な650 bpの塩基配列を有するので、この配列を  
基準にしてシイタケチロシナーゼ遺伝子の全塩基配列を  
決定した。決定した塩基配列を配列番号3に示す。

【0073】シイタケチロシナーゼをコードするcDN  
Aの塩基配列は、配列番号3で表される塩基配列を含  
み、また、第21-23番目の塩基配列によってコードされ  
るメチオニンから第1875-1877番目のTAAで終了する単一  
のオープンリーディングフレーム(アミノ酸618残基)  
が存在していた。このオープンリーディングフレームに

よりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に記載し  
た。なお、このオープンリーディングフレームの上流に  
は、20塩基の非翻訳領域(第1~20番目の塩基配列)が  
存在していた。

【0074】さらに、オープンリーディングフレームの  
下流にはポリ(A)領域が存在しているので、このcDN  
Aは完全長のものであると言える。これらの塩基配列か  
ら、シイタケから得られたチロシナーゼのアミノ酸残基  
数は618個で、その分子量は68kDaと推定される。

【0075】ここに得られたシイタケチロシナーゼのア  
ミノ酸配列領域を、麹菌(*Aspergillus oryzae*)、アカ  
パンカビ(*Neurospora crassa*)及びマッシュルーム(*A  
garicus bisporus*)のチロシナーゼのアミノ酸配列領域  
と比較すると、それぞれ36.3%、30.8%及び54.0%の相  
同性が認められるが、かなりの部分で異なっていること  
から、配列番号3及び4で表される塩基配列及びアミノ  
酸配列は、シイタケ特有のものであることが示された。

【0076】(13) シイタケのゲノムライブラリーの  
調製

液体培養により生育させた菌糸をガラスフィルターで回  
収し、ペーパータオルで菌糸の水分を可能な限り搾り取  
った。回収した菌糸約1gを乳鉢に入れ、液体窒素を適  
量加えて磨砕した。磨砕した菌糸を50mlポリプロピレン  
チューブに移し、20mlのTESS緩衝液(0.73Mスクロ  
ース、10mMトリス-HCl緩衝液(pH 8.0)、1mM EDTA(pH  
8.0)、1% SDS)を加えて、65℃で1時間インキュベ  
ートした。これに終濃度が1Mとなるように5M NaClを  
加えて、8,000×gで20分間遠心し、上清を回収した。回  
収した上清に等量のフェノール・クレゾール試薬(100g  
のフェノールに、4.7mlのm-クレゾールを加えて50℃で  
溶解させ、そこに8-キノリノールを0.05%となるよう  
に加えて、さらに等量の1M NaClで平衡化させたもの)  
を加え、1,300×gで5分間遠心して、上清(水層)を回  
収した。さらに、クロロホルム処理、エタノール沈殿を  
行って、1mlのTE緩衝液に溶解した。その溶液をRNase  
A及びproteinase Kで処理し、フェノール・クロロホル  
ム処理とエタノール沈殿を行って、適当量のTE緩衝液に  
溶解し、染色体DNA試料とした。

【0077】得られたDNA試料を制限酵素Sau 3AIに  
よって消化し、フェノール・クロロホルム処理後、エタ  
ノール沈殿を行って適当量のTE緩衝液に溶解した。得ら  
れたDNA断片を用い、Lambda EMBL3/Bam HI Vector K  
it (Stratagene社製)によりゲノムDNAライブラリー  
を作製した。

【0078】(14) ゲノムライブラリーからのチロシ  
ナーゼ遺伝子の単離

上記(13)において作製したゲノムライブラリーか  
ら、上記(7)と同様の手順でチロシナーゼ遺伝子  
を単離した。ブランクの形成及びライブラリーの増幅  
は、大腸菌XL1-blue MRA株を使用して、Lambda EMBL3 /



Bam HI vector kit (Stratagene社製) のマニュアルに基づいて行い、プラークハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、cDNAライブラリーからのチロシナーゼの単離と同じ手順で行った。そして、得られたシグナル付近のプラークを掻き取り、それをSM緩衝液 (100mM NaCl, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01%ゼラチンを含む) に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈して、プレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、ゲノムのチロシナーゼ遺伝子を含む組換え体ファージを得た。クローン化したファージをそれぞれプレーティングし、37℃で6～8時間インキュベートしてプラークを形成させた。プラークが形成したプレートに10mlのSM緩衝液を重層し、4℃で12時間以上振盪培養して、ファージをSM緩衝液中に遊離させた。ファージを含むSM緩衝液を15mlのプロピレンチューブに回収し、クロロホルムを終濃度5%となるように加えて、室温に15分間放置し、それを1,500×gで10分間遠心し、上清を回収した。次いで、Wizard Lambda Preps DNA Purification System (Promega社製) を用いて、回収した上清からファージDNAを精製し、塩基配列の決定に供した。

#### 【0079】(15) 塩基配列の決定

上記(14)において得られた陽性クローンの塩基配列を、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer社製) を用いて決定した。PCR反応はそのマニュアルに基づいて行い、得られたPCR産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer社製) によって解析した。決定したチロ

シナーゼ遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列を配列番号5に示す。チロシナーゼ遺伝子を含むcDNAの塩基配列である配列番号3との比較から、解析したチロシナーゼ遺伝子は図1のように8つのイントロン(直線部分)を有する9つのエキソンに分断されて、ゲノム上に存在することを見出した。

#### 【0080】〔実施例2〕pLT-hphベクターの構築

(1) チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域の単離  
単離したチロシナーゼ遺伝子の塩基配列(配列番号5)のうち、翻訳開始コドン(配列番号5中の第2656～2658塩基)を含む5'側上流域約2.6 kbの領域には、各種プロモーターに見出される特定塩基配列(TATA box, CAAT box等)が存在していた。そこで、この領域をプロモーター領域とみなし、ゲノムチロシナーゼ遺伝子を鋳型としてPCRを行い、チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域を大量に調製した。

【0081】5'センスプライマー(TproUプライマーともいう)として、翻訳開始点から-2647～-2621bpの位置に存在する配列5'-ATTCCAAGCCTGTATCCCTCCTATCG-3'(配列番号10)を有するものを用い、3'アンチセンスプライマー(TproLプライマーともいう)として、翻訳開始点から-38～-10bpの位置に存在する配列5'-CTCTGTGAAACAAATCGGTGTGTGGG-3'(配列番号11)を有するものを用いた。PCRの反応液組成は以下の通りである。

#### 【0082】

##### 【表1】

ゲノムDNA溶液	1.0 μl (10 ng)
10×PCR緩衝液	5.0 μl
25mM MgCl <sub>2</sub>	5.0 μl
2mM dNTPミックス	4.0 μl
20 μM プライマー (センス)	0.5 μl
20 μM プライマー (アンチセンス)	0.5 μl
5 U/μl Taq ポリメラーゼ	0.25 μl
滅菌水	33.75 μl
全量	50 μl

【0083】PCRは96℃で30秒間の熱変性、60℃で30秒間のアニーリング、72℃で2分間の伸長反応の条件を1サイクルとして、30サイクル行った。反応終了後、反応液を新しいマイクロチューブに移し、そのうち5 μlを1%アガロースゲルによる電気泳動に供し、増幅断片の確認を行った。次いで、残りの反応液にフェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、ペレット化したPCR産物を20 μlのTE緩衝液に溶解した。

【0084】得られたPCR産物を1%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約2,650bpの断片を切り出した。その断片をQIAEX II (QIAGEN社製) を用いてゲルから抽出し、配列番号1で表される塩基配列を有するチロシナーゼ遺伝子プロモーターを精製した。

【0085】(2) チロシナーゼ遺伝子のターミネータ

#### 一領域の単離

単離したチロシナーゼ遺伝子(配列番号5)の翻訳終止コドン(配列番号5中の第4972～4974塩基)を含む3'側下流域約1 kbの領域をチロシナーゼ遺伝子ターミネーター領域とみなし、ゲノムチロシナーゼ遺伝子を鋳型として、PCRを行った。

【0086】5'センスプライマー(TterUプライマーともいう)として、終止コドンから14～51bpの位置に存在する配列5'-GGAATTCGAATGAATATCGCGATAAATAAATAATGT-3'(配列番号12)を有するものを用い、3'アンチセンスプライマー(TterLプライマーともいう)として、終止コドンから961～988bpの位置に存在する配列5'-AGCTTCTGCCCTCTTCTGCCGCTCTTA-3'(配列番号13)を用いた。PCR反応はプロモーターの単離と同条件で行った。

た。

【0087】得られたPCR産物を1%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約1,000bpの断片を切り出した。その断片をQIAEX II (QIAGEN社製)を用いてゲルから抽出し、PCR産物を精製し、配列番号2で表される塩基配列を有するチロシナーゼ遺伝子ターミネーターを調製した。

#### 【0088】(3) 組換えベクターの構築

上記(1)及び(2)において単離したチロシナーゼのプロモーター領域とターミネーター領域を利用し、異種生物由来の遺伝子としては、大腸菌由来のハイグロマイシンB耐性遺伝子(hygromycin B phosphotransferase, hph) [Gritzand Davies, Gene, 25, 179-188, 1983]を用い、シイタケを宿主とする組換えベクターを構築した。

【0089】すなわち、hph遺伝子をマーカー遺伝子として有するpCHベクター [Matsuki et al., Mol. Gen. Genet., 220, 12-16, 1989] を制限酵素BamH Iで消化することによりhph遺伝子断片を切り出した。その断片を、BamH Iで消化した大腸菌のプラスミドベクターpUC19 [Yanisch-Perron et al., Gene, 33, 109-119, 1985] に組み込み、コンピテント細胞Top 10 F' (Invitrogen社製)に導入して、hph遺伝子を含むpUC19プラスミドを大量に調製した。そのプラスミドベクターを制限酵素Xba Iで消化し、平滑末端化、脱リン酸化を行った後、pT7Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen社製)を用いて、単離したチロシナーゼ遺伝子のプロモーターとライゲーションさせた。こうして作出したプラスミドの内、転写方向的に正しく挿入されたものを選抜して、大量に調製した。このプラスミドベクターを制限酵素Sma Iで消化し、脱リン酸化を行った後、上述の方法で単離したチロシナーゼ遺伝子のターミネーターとライゲーションさせた。こうして作出したプラスミドの内、転写方向的に正しく挿入されたものを選抜して、大量に調製した。得られたpLT-hphベクターの模式図を図2に示す。

【0090】〔実施例3〕REMI法によるシイタケの形質転換

#### (1) プロトプラストの調製

野性型のシイタケ菌株S-1の二核菌糸を、0.25×MYPG寒天培地(0.25%麦芽エキス、0.1%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.5%グルコース、1.5%寒天)上、25℃で2週間培養した。生育した菌糸をかきとり、50 mlの0.25×MYPG液体培地で1週間培養した。得られた菌糸はガラスフィルターで集菌し、50mlの0.25×MYPG液体培地に懸濁してポリトロンホモジナイザーで裁断し、100μmのナイロンメッシュで濾過した濾過菌糸をさらに0.25×MYPG液体培地中、25℃で5日間培養した。培養菌糸は100μmのナイロンメッシュで集菌後、クエン酸緩衝液(0.6 Mマンニトールを含む50mMクエン酸緩衝液、pH5.6)で2回洗浄し、菌糸1g当たり10mlの酵素溶液(2.5%セルラー

ゼ、0.1%キチナーゼを含むクエン酸緩衝液)に菌糸を懸濁し、28℃で3〜4時間インキュベートした。酵素処理した菌糸を40μmのナイロンメッシュで濾過し、濾液を1,500×gで10分間遠心分離して、プロトプラストを沈殿させた。上清を捨て、プロトプラストをSTC緩衝液(10mM塩化カルシウム、1.2Mソルビトールを含む10mM Tris-HCl、pH7.5)で洗浄後、再び1mlのSTC緩衝液にプロトプラストを懸濁し、顕微鏡でプロトプラストの数を計測した。最終的には、STC緩衝液100μlに0.5〜1.0×10<sup>7</sup>個のプロトプラストとなるように調整して、形質転換用のプロトプラストとした。

#### 【0091】(2) pLT-hphベクターの導入

形質転換は、pLT-hphベクターを3箇所切断する制限酵素Dra I、又は1箇所切断する制限酵素Hind III、Sal I若しくはSph I(図1参照)を用いたRestriction Enzyme Mediated Integration (REMI) 法によって行った(特開平11-155568)。すなわち、2.5μgのpLT-hphと50ユニットのDra I、Hind III、Sal I又はSph Iを含む150μlのSTC緩衝液に、上記のプロトプラスト懸濁液100μlを穏やかに加え、氷中で20分間インキュベートした。これに62.5μlのPEG溶液(10mM塩化カルシウム、60% PEG4000を含む10mM Tris-HCl、pH7.5)を加え、氷中で20分間インキュベートした。さらに3.125mlのPEG溶液を加えて、室温で20分間インキュベートした。次に、10mlのSTC緩衝液を加えて溶液全体を十分に懸濁し、1,500×gで10分間遠心し、プロトプラストを沈殿させた。回収したプロトプラストを4mlのMS液体培地(2%麦芽エキス、0.6Mスクロース)に懸濁し、25℃で3〜4日間静置培養した。

【0092】(3) ハイグロマイシンB耐性菌糸の選抜  
プロトプラストから再生した菌糸を1,500×gで10分間遠心することで回収した。回収した菌糸を1mlのMS液体培地に再懸濁し、5μg/mlハイグロマイシンBを含む最少寒天培地(2%グルコース、0.2%酒石酸アンモニウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.1%リン酸二水素カリウム、0.112%炭酸ナトリウム、0.132%フマル酸、10ppm硫化鉄、8.8ppm硫化亜鉛、7.2ppm塩化マンガン、pH4.5、1.5%寒天)にまき、25℃で5日間培養した。次に、一旦溶解し、50℃程度に冷却させた0.25×MYPG寒天培地に、20μg/mlハイグロマイシンBを加え、それを最少寒天培地上で生育した菌糸上に重層した。25℃で約5日間培養後、増殖してきた菌糸を分離し、新しい20μg/mlハイグロマイシンBを含む新鮮なMYPG寒天培地に植え替えた。さらに1週間程度培養し、増殖してきた菌糸を新しい20μg/mlハイグロマイシンBを含む新鮮なMYPG寒天培地に植え替えて培養し、ハイグロマイシン耐性を獲得した菌糸を選抜した。

#### 【0093】(4) 結果

その結果を表2に示す。数値は3連の実験の平均値である。pLT-hphベクターの導入によりハイグロマイシン耐

性を獲得したシイタケ形質転換体が作出され、本発明の  
発現用組換えベクターが、シイタケを宿主とする異種遺  
伝子発現用ベクターとして有効であることを確認した。

【0094】  
【表2】

形質転換体出現率

プラスミドベクター	制限酵素	形質転換体数/2.5 $\mu$ gベクターDNA
pLT-hph	50u Dra I	18.0
pLG-hph	50u Dra I	22.0

【0095】

【発明の効果】本発明により、シイタケチロシナーゼ遺  
伝子の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロ  
シナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、  
該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換

えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、並び  
に該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法が提供  
される。

【0096】  
【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Iwate prefecture

<120> Promoter Gene

<130> P99-0629

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2639

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<400> 1

```

atccaagcc tgtattccct cctatcgcg gaatcggtta cctatccacc cttttctctt 60
tcgatacgac gccggaagat aggcaaacag cttaagagc gtatcatgaa acagaagacg 120
ctaaggagat atatgagcac tcaccggtcg gattgataga ggcgttatcc gcatcatctc 180
tagttttgga tccgagaaaa ttcccttget tgattgtctt agcacagtac gaccctgacg 240
tcattaagtt cggattgctt tcaagagata acagtcgaga aatcgtcttc caggcaagaa 300
atccaagatt caaccttctc gtttatagag gaatatcgca gaaaaagtcc gcaaggaaac 360
ttaccagagt tcgtggtcgt ggcgtggacac aaccatattt cacatgtttg ttcaattgga 420
acagaggacg acgtgctggg gagattactg cgcgagtttg ttgggaaagt ctgttcaagg 480
tgagccagcg attcgtaaag atgtactgta actgaatgaa cgagtcgcgt catagattta 540
cttggaaagta caaaggcaaa gatttgacg cttagacgaa gcagtggtac ttactgtaat 600

```

cttgatatgg atgtgtatga atggataccc gttcaagttg aagagaaagc gttgcctaac 660  
 ttcagaattg aacgcagtcg gaccaagggg cattcggtc cggaatgccg gactcgacgc 720  
 accaccgagt tcccccttga caagcctttg cgcaaagtgt taaatgtagt cctggaattc 780  
 caaagagatt ttattcaaga acgagaatat tatgtacatt ca ctccg tgaactaacc 840  
 aggtgcactg ttacatgtca cgtgtagggc gggatatctac tatctgccat tcggatgacc 900  
 gaggatgccg ctgggatatc gtgactaagc gattcagccg tcacgatgg gacatgaata 960  
 tgcataaata ttgaatcagc aaaaatgaac aacacccctt ggtcttctcg cttctcagag 1020  
 gcatcctgag gcaacctcta cggaattttt catgttcgtg tt caccgt ctccgcagct 1080  
 gtactacctc tgacataaaa cttttcccg ttccaatga gacctcaca cctctcgagc 1140  
 ttggataagc cttcagcgtt atggattcga ttccagcttc cgcccccggt gtcttctcgt 1200  
 ttctaataa atttctgga catgtcatgg ttgacaagag caatctctct gaaaaactat 1260  
 acctataatt ttgaccggcg gtgtaatcag gtagaatcag gttgtagtaa tgttcggaaa 1320  
 gttcaacctt aggtcttccc tccccctctc tcccatgctg ctgtcactgt cactcgtact 1380  
 tctctggaag taacagatat tggaactgtg tagcagaaaa caagtcgaac ggacatcaca 1440  
 tacctctcct ttgtctgcca ccaaatttct cctttctgtt gtatcccggt tgtctcaaat 1500  
 gtccgcatct tgttctcga ttctcgagac acatagcgt agtctaaat cccaatcctt 1560  
 tctaggagct ctcatcttca actctcatca aataacacgt tcaaatcaac caaagcctgg 1620  
 gtatacaga ctttctgctt cgccatttca ttctgcattg atccacatcc tgactgggat 1680  
 acacggctga cgagataagg agccgatgg cacttaagaa gtccagatta tatcgactgc 1740  
 gatgtaataa gaatagaggt gagcagtgat gagctatgta tgtttccgga tcacgtttc 1800  
 ttctcattta cacaatgtc ctacaaacga gcaaagtga ctaccactg gattgttgaa 1860  
 cgaatatitt tccaaaaca aatTTTTTTT ccaatttata tgacctagg tgacacaagt 1920  
 ggttggtggc tttagtcaag atgcttcac ggcgttgaag ccatgttcgt gtataagtat 1980  
 gaacccatag acgcggtcg aattttcagt gccggtgtca atggagtaat cctcgtgtt 2040  
 cgggtacat agtttaggta gttggtgtta atagcgacat acaattcaag gaggcctaac 2100

aaaacactac ttcgggaacc aaggattatt accattgctc agtgaaaagt tagatccgta 2160  
 caaactcagc ccgaatcttg actaaaacac atactgaaga cagccgaaga agcaatggaa 2220  
 tgaatctagt cccgttggtg ttgacctctt ttttctatca ctcaatcgga cggcagattc 2280  
 cagaggccga ccaatactgc taagaactga gacagagget gcttaaccga catgattcta 2340  
 tcaaacaaat ctcagccact ttctccgctt ctgtcgggac tgcctcttg ttcaatttgt 2400  
 tacttgatcg ctatgttggt ctcgtaagat ataatatgga cgtccccccc ctacggagtt 2460  
 cgatggaagt ataagcaaat gccaaactag ccaagcttcg aaggcaatgc ttaggggta 2520  
 gatcgtgtat ctgtcttggc tgttagtatt acagcactgg agtagctgtg ctcattcgga 2580  
 tccttaaaag ctcgaggtct aaatcttcta accccacaca ccgatttgtt ttacacag 2639

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 971

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lentinula edodes

&lt;400&gt; 2

ggaattcgaa tgaactatcg cgataaataa ataatgtcct cgttgtgtgt atgtgtaatg 60  
 ttggtttttt agcggttgaa gacaggtagc gctgagcctg gccattaatg gagaatgatt 120  
 cggtaactcaa attgacatac atacctctag accggtgta caccatgtga gcaaggcgat 180  
 atttctgcgc gttctaattc actcagatgc tgcgcgcgca tccccaggca tgtgttcaat 240  
 acacagctca caccatccgc gctctcctt ttgcctatca agaatcagt taaggccatt 300  
 ttgaatcgga aagaaaatca cgcacgtagg gactgcaact actgcagtgg ttgcaaaaag 360  
 caagctcatg caagcgaggg taaagacata agtccaacga gccattggag tgctgggata 420  
 tgataggata gtagaggata gttacttat actggctagc tccgattgct gggtaagtgg 480  
 gaaggagaa ctgacgggga cgagtgatgg agagaaagac gactctccac agcagttttt 540  
 ataacctagt tgtgactaac tgtacatgtt gccaatctcc cgcataactg tatacataag 600  
 tattagcaaa tctttccatc aaagtgaac cgtgacgggg ctactaatta tgctatggga 660  
 ccgcggtata atgtacgaac gcactgacca gtaaatcacc acagtatga ggtgcaacct 720  
 ggtgcaacaa ggcgcagcac cgtcctgttc cattccatct ttgtaccata cccatttctc 780

ttgataga tatcctgttg ttcttgagtt tagagtacaa acagctcgga agttcattca 840  
 tggataaagt ctttcaatct cegttcgacg caggagcggc gctccccggt gatcattgta 900  
 tcattcttgac taattcgtcg ggaaggtgta aaaggaggtg tatataagga cggcagaaga 960  
 gggcagaagc t 971

<210> 3  
 <211> 2050  
 <212> DNA  
 <213> Lentinula edodes

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (21)..(1874)

<400> 3  
 tttcacaga gttcatttag atg tct cat tat ctt gtc act ggc gca act gga 53  
 Met Ser His Tyr Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly  
 1 5 10  
 gga tca acc tct ggg gca gca gca ccc aat cgt ctc gaa att aat gat 101  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ala Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp  
 15 20 25  
 ttc gtc aaa caa gaa gac cag ttt tct ctc tat att cag gct ttg caa 149  
 Phe Val Lys Gln Glu Asp Gln Phe Ser Leu Tyr Ile Gln Ala Leu Gln  
 30 35 40  
 tac att tat tca agt aaa agc caa gac gat att gac tcc ttc ttc caa 197  
 Tyr Ile Tyr Ser Ser Lys Ser Gln Asp Asp Ile Asp Ser Phe Phe Gln  
 45 50 55  
 atc gga ggg atc cat ggc ctt ccg tat gtc cct tgg gac ggc gca gga 245  
 Ile Gly Gly Ile His Gly Leu Pro Tyr Val Pro Trp Asp Gly Ala Gly  
 60 65 70 75  
 aat aag cca gta gac act gac gcc tgg gag gga tat tgc act cat ggc 293  
 Asn Lys Pro Val Asp Thr Asp Ala Trp Glu Gly Tyr Cys Thr His Gly  
 80 85 90  
 agc gtg tta ttt cca acc ttc cac cgt ccg tat gtt cta ctc atc gag 341  
 Ser Val Leu Phe Pro Thr Phe His Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ile Glu  
 95 100 105  
 caa gca atc cag gct gcg gcc gtc gat atc gcc gca aca tac atc gta 389  
 Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ala Val Asp Ile Ala Ala Thr Tyr Ile Val  
 110 115 120



gat aga gct cgt tac cag gac gcc gcg ttg aat cta cgt cag cca tac 437  
Asp Arg Ala Arg Tyr Gln Asp Ala Ala Leu Asn Leu Arg Gln Pro Tyr  
125 130 135

tgg gat tgg gcc cga aac cca gtt cct ccg ccg gaa gta ata tct ctg 485  
Trp Asp Trp Ala Arg Asn Pro Val Pro Pro Pro Glu Val Ile Ser Leu  
140 145 150 155

gac gag gtt acc atc gtt aac cca agc gga gag aaa atc tct gtt ccc 533  
Asp Glu Val Thr Ile Val Asn Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ser Val Pro  
160 165 170

aac cct ctc cga cgt tat aca ttc cac ccc ata gat ccg tcc ttc cct 581  
Asn Pro Leu Arg Arg Tyr Thr Phe His Pro Ile Asp Pro Ser Phe Pro  
175 180 185

gaa cca tat cag tct tgg tcg act act ctt cga cat cct ttg tcc gat 629  
Glu Pro Tyr Gln Ser Trp Ser Thr Thr Leu Arg His Pro Leu Ser Asp  
190 195 200

gat gcc aat gca tcg gac aat gtt cca gaa ttg aaa gcg acg ttg aga 677  
Asp Ala Asn Ala Ser Asp Asn Val Pro Glu Leu Lys Ala Thr Leu Arg  
205 210 215

agt gct ggt ccc caa ctc aag acc aag acg tac aac ctt ctg acg cga 725  
Ser Ala Gly Pro Gln Leu Lys Thr Lys Thr Tyr Asn Leu Leu Thr Arg  
220 225 230 235

gtt cat aca tgg ccg gcg ttc agt aac cat acg ccc gac gat gga ggg 773  
Val His Thr Trp Pro Ala Phe Ser Asn His Thr Pro Asp Asp Gly Gly  
240 245 250

agt acc agc aat agt ctt gaa ggt atc cac gac agt gtc cac gtc gat 821  
Ser Thr Ser Asn Ser Leu Glu Gly Ile His Asp Ser Val His Val Asp  
255 260 265

gtt ggt gga aac ggg caa atg tca gat cct tca gta gca gga ttc gat 869  
Val Gly Gly Asn Gly Gln Met Ser Asp Pro Ser Val Ala Gly Phe Asp  
270 275 280

ccc att ttc ttt atg cac cat gcc cag gtt gat cgt ctg ctt tca ttg 917  
Pro Ile Phe Phe Met His His Ala Gln Val Asp Arg Leu Leu Ser Leu  
285 290 295

tgg tct gca ttg aat ccg agg gtg tgg att acc gac gga cct tct ggc 965  
Trp Ser Ala Leu Asn Pro Arg Val Trp Ile Thr Asp Gly Pro Ser Gly  
300 305 310 315

gat ggg aca tgg act atc cct ccc gac act gta gtt gga aag gat act 1013

Asp Gly Thr Trp Thr Ile Pro Pro Asp Thr Val Val Gly Lys Asp Thr	
320 325 330	
gat ctt act ccg ttc tgg aac acc cag tca tcg tat tgg att tct gcc	1061
Asp Leu Thr Pro Phe Trp Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Ala	
335 340 345	
aat gtg acc gat acg tcc aag atg gga tat aca tat cca gaa ttt aac	1109
Asn Val Thr Asp Thr Ser Lys Met Gly Tyr Thr Tyr Pro Glu Phe Asn	
350 355 360	
aat ctc gat atg gga aat gaa gtt gca gtt cga tct gct ata gct gca	1157
Asn Leu Asp Met Gly Asn Glu Val Ala Val Arg Ser Ala Ile Ala Ala	
365 370 375	
caa gtt aac aag ctc tat ggt gga cca ttc acg aaa ttc gcg gca gca	1205
Gln Val Asn Lys Leu Tyr Gly Gly Pro Phe Thr Lys Phe Ala Ala Ala	
380 385 390 395	
att caa caa cct tct tct caa act act gca gac gct tcc acg att ggc	1253
Ile Gln Gln Pro Ser Ser Gln Thr Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ile Gly	
400 405 410	
aat gtc aca agc gat gcc tct tcg cac ctg gta gac agc aaa atc aat	1301
Asn Val Thr Ser Asp Ala Ser Ser His Leu Val Asp Ser Lys Ile Asn	
415 420 425	
ccg acg cca aat aga agc att gat gat gcc cct caa gta aaa ata gct	1349
Pro Thr Pro Asn Arg Ser Ile Asp Asp Ala Pro Gln Val Lys Ile Ala	
430 435 440	
tcc act cta agg aac aac gaa caa aag gag ttt tgg gaa tgg act gcc	1397
Ser Thr Leu Arg Asn Asn Glu Gln Lys Glu Phe Trp Glu Trp Thr Ala	
445 450 455	
cgt gtg cag gtc aag aag tac gaa ata ggt gga agc ttc aag gtc tta	1445
Arg Val Gln Val Lys Lys Tyr Glu Ile Gly Gly Ser Phe Lys Val Leu	
460 465 470 475	
ttc ttc tta ggc agt gtg ccc agt gat ccc aag gaa tgg gct act gat	1493
Phe Phe Leu Gly Ser Val Pro Ser Asp Pro Lys Glu Trp Ala Thr Asp	
480 485 490	
ccc cat ttt gtc gga gca ttc cac ggg ttc gtg aat agc tct gcc gaa	1541
Pro His Phe Val Gly Ala Phe His Gly Phe Val Asn Ser Ser Ala Glu	
495 500 505	
cga tgc gca aac tgt cgg cgt caa cag gat gtc gtt ctc gaa gga ttc	1589
Arg Cys Ala Asn Cys Arg Arg Gln Gln Asp Val Val Leu Glu Gly Phe	
510 515 520	

gtg cat ctc aac gaa ggt att gcg aac att tcc aac ttg aac tca ttc 1637  
 Val His Leu Asn Glu Gly Ile Ala Asn Ile Ser Asn Leu Asn Ser Phe  
 525 530 535

gac cca atc gtt gtg gaa ccg tat ctt aaa gag aac ctc cac tgg cgt 1685  
 Asp Pro Ile Val Val Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Leu His Trp Arg  
 540 545 550 555

gtg caa aag gta tgc ggc gag gta gtc aat ttg gat gca gcg aca tcc 1733  
 Val Gln Lys Val Ser Gly Glu Val Val Asn Leu Asp Ala Ala Thr Ser  
 560 565 570

ctg gaa gtc gta gtt gtc gct acg cgt ttg gag ttg cct cct gga gag 1781  
 Leu Glu Val Val Val Val Ala Thr Arg Leu Glu Leu Pro Pro Gly Glu  
 575 580 585

atc ttc cca gta cct gca gag aca cac cac cat cac cat atc aca cat 1829  
 Ile Phe Pro Val Pro Ala Glu Thr His His His His Ile Thr His  
 590 595 600

ggc cgt cct ggt ggt tct cgc cac agc gtc gca tct tca agc tcc 1874  
 Gly Arg Pro Gly Gly Ser Arg His Ser Val Ala Ser Ser Ser Ser  
 605 610 615

taatcagaca aagagtggaa ttggaatgaa ctatcgcat aaataaataa tgcctcgtt 1934

gtgcgtatgt gtaatgttgg ttttttttagc ggttgaagac aggtagcgt gagcctggcc 1994

attaatggag aatgattcgg tactcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2050

<210> 4

<211> 618

<212> PRT

<213> Lentinula edodes

<400> 4

Met Ser His Tyr Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ser Thr Ser Gly  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp Phe Val Lys Gln Glu  
 20 25 30

Asp Gln Phe Ser Leu Tyr Ile Gln Ala Leu Gln Tyr Ile Tyr Ser Ser  
 35 40 45

Lys Ser Gln Asp Asp Ile Asp Ser Phe Phe Gln Ile Gly Gly Ile His  
 50 55 60

Gly Leu Pro Tyr Val Pro Trp Asp Gly Ala Gly Asn Lys Pro Val Asp

65		70		75		80									
Thr	Asp	Ala	Trp	Glu	Gly	Tyr	Cys	Thr	His	Gly	Ser	Val	Leu	Phe	Pro
				85						90				95	
Thr	Phe	His	Arg	Pro	Tyr	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala
				100					105				110		
Ala	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Ala	Thr	Tyr	Ile	Val	Asp	Arg	Ala	Arg	Tyr
				115					120				125		
Gln	Asp	Ala	Ala	Leu	Asn	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Trp	Asp	Trp	Ala	Arg
				130					135				140		
Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Leu	Asp	Glu	Val	Thr	Ile
145						150				155				160	
Val	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ser	Val	Pro	Asn	Pro	Leu	Arg	Arg
				165					170				175		
Tyr	Thr	Phe	His	Pro	Ile	Asp	Pro	Ser	Phe	Pro	Glu	Pro	Tyr	Gln	Ser
				180					185				190		
Trp	Ser	Thr	Thr	Leu	Arg	His	Pro	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Asn	Ala	Ser
				195					200				205		
Asp	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly	Pro	Gln
				210					215				220		
Leu	Lys	Thr	Lys	Thr	Tyr	Asn	Leu	Leu	Thr	Arg	Val	His	Thr	Trp	Pro
225						230				235				240	
Ala	Phe	Ser	Asn	His	Thr	Pro	Asp	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Asn	Ser
				245					250				255		
Leu	Glu	Gly	Ile	His	Asp	Ser	Val	His	Val	Asp	Val	Gly	Gly	Asn	Gly
				260					265				270		
Gln	Met	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Ala	Gly	Phe	Asp	Pro	Ile	Phe	Phe	Met
				275					280				285		
His	His	Ala	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Ser	Ala	Leu	Asn
				290					295				300		
Pro	Arg	Val	Trp	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Ser	Gly	Asp	Gly	Thr	Trp	Thr
305						310				315				320	
Ile	Pro	Pro	Asp	Thr	Val	Val	Gly	Lys	Asp	Thr	Asp	Leu	Thr	Pro	Phe
				325						330				335	

Trp Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Ala Asn Val Thr Asp Thr  
 340 345 350

Ser Lys Met Gly Tyr Thr Tyr Pro Glu Phe Asn Asn Leu Asp Met Gly  
 355 360 365

Asn Glu Val Ala Val Arg Ser Ala Ile Ala Ala Gln Val Asn Lys Leu  
 370 375 380

Tyr Gly Gly Pro Phe Thr Lys Phe Ala Ala Ala Ile Gln Gln Pro Ser  
 385 390 395 400

Ser Gln Thr Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ile Gly Asn Val Thr Ser Asp  
 405 410 415

Ala Ser Ser His Leu Val Asp Ser Lys Ile Asn Pro Thr Pro Asn Arg  
 420 425 430

Ser Ile Asp Asp Ala Pro Gln Val Lys Ile Ala Ser Thr Leu Arg Asn  
 435 440 445

Asn Glu Gln Lys Glu Phe Trp Glu Trp Thr Ala Arg Val Gln Val Lys  
 450 455 460

Lys Tyr Glu Ile Gly Gly Ser Phe Lys Val Leu Phe Phe Leu Gly Ser  
 465 470 475 480

Val Pro Ser Asp Pro Lys Glu Trp Ala Thr Asp Pro His Phe Val Gly  
 485 490 495

Ala Phe His Gly Phe Val Asn Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ala Asn Cys  
 500 505 510

Arg Arg Gln Gln Asp Val Val Leu Glu Gly Phe Val His Leu Asn Glu  
 515 520 525

Gly Ile Ala Asn Ile Ser Asn Leu Asn Ser Phe Asp Pro Ile Val Val  
 530 535 540

Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Leu His Trp Arg Val Gln Lys Val Ser  
 545 550 555 560

Gly Glu Val Val Asn Leu Asp Ala Ala Thr Ser Leu Glu Val Val Val  
 565 570 575

Val Ala Thr Arg Leu Glu Leu Pro Pro Gly Glu Ile Phe Pro Val Pro  
 580 585 590

Ala Glu Thr His His His His His Ile Thr His Gly Arg Pro Gly Gly  
 595 600 605

Ser Arg His Ser Val Ala Ser Ser Ser  
610 615

<210> 5

<211> 6290

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<400> 5

aatgtgaatt ccaagcctgt attccctcct atcgcgaggaa tcgtttacct atccaccct 60  
ttctctttcg atacgacgcc ggaagatagg caaacagctt taagagcgta tcatgaaaca 120  
gaagacgcta aggagatata tgagcactca ccggtcggat tgatagagcg gttatccgca 180  
tcatctctag ttttgatcc gagaaaattc ccttgcctga ttgtcttagc acagtacgac 240  
ccgtacgtca ttaagttcgg attgctttca agagataaca gtcgagaaat cgtcttcacg 300  
gcaagaaatc caagattcaa ccttctcgtt tatagaggaa tctcgagaa aaagtccgca 360  
aggaatctta ccagagttcg tggctcgtgc tggacacaac catatttcac atgtttgttc 420  
aattggaaca gaggacgacg tgctggcgag attactgcgc sagtttggtg ggaaagtctg 480  
ttcaaggtga gccagcgatt cgtaaagatg tactgtaact gaatgaacga gtcgcgtcat 540  
agatttactt ggaagtacaa aggcaaagat ttgacgctt agacgaagca gtgtacttta 600  
ctgtaatctt gatatggatg tgtatgaatg gatacccggt caagttgaag agaaagcgtt 660  
gcctaacttc agaattgaac gcagtcggac caaggggcat tcggtcccg aatgccagac 720  
tcgacgcacc accgagttcc ccttcgacaa gcctttgcgc aaagtgttaa atgtagtcct 780  
ggaattccaa agagatttta ttcacgaacg agaatattat gtacattcga ttctccgtga 840  
actaaccagg tgcactgtta catgtcacgt gtagggcggg tatctactat ctgccattcg 900  
gatgaccgag gatgccactg ggatategtg actaagcgat tcagccgtca tcgatgggac 960  
atgaatatgc atgaatattg aatcagcaaa atgaatcaac accccttggt cttctcgtt 1020  
ctcagaggca tcttgaggca acctctacgg aatttttcat gtctgtgta ccaccgtctc 1080  
cgcagctgta ctacctctga cataaaactt ttcccgttc ccaatgagac ctccacacct 1140  
ctcgagcttg gataagcctt cagcgttatg gattcgattc cagcttcgcg ccccggtgtc 1200



ttctcgtttc ctaatgaatt tcctggacat gtcatggtg acaagagcaa tctctctgaa 1260  
 aaactatacc tataattttg accggcgggtg taatcaggta gaalcagggt gtagtaatgt 1320  
 tcggaaagtt caaccctagg tcttcctctc ccttctctcc catgctgctg tcaactgtcac 1380  
 tcgtacttct ctggaagtaa cagatatgtg aactgtgtag cagaaaacaa gtcgaacgga 1440  
 catcacatac ctctcctttg ctgcgcacca aattttcccc ttctgttgta tcccggttgt 1500  
 ctcaaatgtc ggcactctgt tcctcgattt cgcggacaca tagcgctagt gctaaatecc 1560  
 aatcctttct aggagctctc atcttcaact ctcatcaaat aacacgttca aatcaaccaa 1620  
 agcctgggta tatcagacct ttcgcttcgc catttcattc tgcattgac caccctctga 1680  
 ctgggataca cggtgacga gataaggagc cggatggcac ttaagaagtc cagattatat 1740  
 cgactcgcat gtaataagaa tagaggtgag cagtgatgag ctatgtatgt ttccggatca 1800  
 tcgtttcttc tcatttacac aatggtccta caaacgagca aagtgtactt accactggat 1860  
 tgttgaacga atatttttcc caaaacaaat tttttttcca atttatatga ccttaggtga 1920  
 cacaagtggt tgggtgcttt agtcaagatg cttgcacggc gttgaagcca tgttcgtgta 1980  
 taagtatgaa cccatagacg cggtcgaat ttccagtgc ggtgtcaatg gagtaacct 2040  
 cgctgttcgg gctacatagt ttaggtagtt ggtgttaata gcgacataca attcaaggag 2100  
 gcctaacaaa acactacttc gggaaccaag gattattacc attgtcagg tgaaagttag 2160  
 atccgtacaa actcagcccc aatcttgact aaaacacata ctgaagacag ccgaagaagc 2220  
 aatggaatga atctagtccc gttggtgtg accctctttt tctatcactc aatcggacgg 2280  
 cagattccag aggcgacca atactgctaa gactgcagac agagctgct taaccgacat 2340  
 gattctatca aacaaatctc agccactttc tccgcttctg tcgggactgc cctcttgctc 2400  
 aatttgttac ttgatccta tgttggtctc gtaagatata atatggacgt ccccccccta 2460  
 cggagtcca tggaagtata agcaaatgcc aacttagcca agcttcgaag gcaatgctta 2520  
 ggggtagat cgtgtatctg tcttggtgtg tagtattaca gcactggagt agctgtgctc 2580  
 attcggatcc ttaaaagctc gaggtctaaa tcttctaacc ccacacaccg atttgtttc 2640  
 acagagtcca ttagatgctc tcattatctt gtcactggcg caactggagg atcaacctct 2700

ggggcagcag cacccaatcg tctcgaaatt aatgatttcg tcaacaaga agaccagttt 2760  
 tctctctata ttcaggtttt gcgtaagtcg aaatcaggct gaatatcgcg gaactcgttc 2820  
 attaattggc acatcatgaa tcagaatata tttattcaag taaaagccaa gacgatattg 2880  
 actccttctt ccaaactcgga gggatccatg gccttcgta tgtcccttgg gacggcgag 2940  
 gaaataagcc agtagaact gacgcctggg aggatattg cactcatggc agcgtgttat 3000  
 ttccaacctt ccaccgtcgg tatgtttctac tcatcgaggt aatcagattt ttttgcata 3060  
 aactgtcgac actgactcat atttgttttg ctctgttagc aagcaatcca ggctgcggcc 3120  
 gtcgatatcg ccgcaacata catcgtagat agagctcgtt accaggacgc cgcgttgaat 3180  
 ctacgtcagc catactggga ttgggccga aaccagttc ctccgccgga agtaatatct 3240  
 ctggacgagg ttaccatcgt taaccaagc ggagagaaaa tctctgttcc caacctctc 3300  
 cgacgttata cattcaccc catagatcgg tcttccctg aaccatatca gtcttggtcg 3360  
 actactcttc gacatccttt gtccgatgat gccaatgcat cggacaatgt tccagaattg 3420  
 aaagcgtag tttactgca tactcaaatg aatagcatga attcttacgt tcattgcagg 3480  
 acgttgagaa gtgtgtgtcc ccaactcaag accaagacgt acaaccttct gacgcgagtt 3540  
 catacatggc cgcggttcag taaccatacg cccgacgatg gagggaglac cagcaatagt 3600  
 cttgaaggta ttacattgg tgttactgc aaacacgagg cttatgtctt ccacaaggta 3660  
 tccacgacag tgtccacgtc gatgttggtg gaaacgggca aatgtcagat ccttcagtag 3720  
 caggtagtc atttttgtta ctcttctcg ctgaataatc gacatacctt cggcaggatt 3780  
 cgatccatt ttctttatgc accatgccca ggttgatcgt ctgctttcat tgtgtctgc 3840  
 attgaatccg aggtgtgga ttaccgacgg accttctggc gatgggacat ggactatecc 3900  
 tcccgaact gtagttgaa aggatactgg tactttcacg ctcgattcgt acggatggac 3960  
 ccgaagtaaa ctaatcatct tataatatcc agatcttact ccgttctgga acaccagtc 4020  
 atcgatttgg atttctgcca atgtgacga tacgtccaag atgggatata cataccaga 4080  
 atttaacaat ctcgatatgg gaaatgaagt tgcagttcga tctgtatag ctgcacaagt 4140  
 taacaagctc tatgttgac cattcacgaa attcgcggca gcaattcaac aaccttctc 4200

tcaaaactact gcagacgctt ccacgattgg caatgtcaca agcgatgcct cttegcacct 4260  
 ggtagacagc aaaatcaatc cgacgcaaaa tagaagcatt gatgatgccc ctcaagtaaa 4320  
 aatagcttcc actctaagga acaacgaaca aaaggagttt tgsgaatgga ctgcccgtgt 4380  
 gcaggtaag aagtacgaaa taggtggaag cttaaggtc ttattcttct taggcagtgt 4440  
 gccagtgat cccaaggaat gggtactga tccccatttt gtccgagcat tccacgggtt 4500  
 cgtgaatagg ttagctgcaa tctcattatc gcaatacttc aatttataat ttggtctgt 4560  
 ttatgtatca cagctctgcc gaacgatgcg caaactgtcg gcgtcaacag gatgtcgttc 4620  
 tcgaaggatt cgtgcatctc aacgaaggta ttgcgaacat ttccaacttg aactcattcg 4680  
 acccaatcgt tgtggaaccg tatcttaaag agaacctcca ctggcgtgtg caaaaggcaa 4740  
 gatttgattg ttctctgtct tcacaatgcc atggatcaac ataactttca ggtatcgggc 4800  
 gaggtagtca atttgatgc agcgacatcc ctggaagtcg tagttgtcgc tacgcgtttg 4860  
 gatttgctc ctggagagat ctcccagta cctgcagaga cacaccacca tcaccatata 4920  
 acacatggtc gtcttsgtgg ttctcgccac agcgtcgcat cttaagctc ctaatcagac 4980  
 aaagagtga attcgaatga actatcgca taaataaata atgtcctcgt tgtgtgtatg 5040  
 tgtaatgttg gttttttagc ggttgaagac aggtagcgt gagcctggcc attaatggag 5100  
 aatgattcgg tactcaaatt gacatacata cctctagacc ggtggtacac catgtgagca 5160  
 agcgatatt tctgcgggtt ctaattcact cagatgctgc gcgcgatcc ccaggcatgt 5220  
 gttaataca cagctcacac catccgcgcg tctccttttc gctatcaagg aatcagttac 5280  
 gccattttg aatcgaaaag aaaatcacgc acgtaggag tgcaactact gcagtgttg 5340  
 caaaaagcaa gctcatgcaa gcgagggtaa agacataagt ccaacgagcc attggagtgc 5400  
 tgggatatga taggatagga taggatagtt aacttatact ggctagctcc gattgtctgg 5460  
 taagtgggaa gggagaactg acggggacga gtgatggaga gaaagacgag tctccacagc 5520  
 agtttttata acctagttgt gactaactgt acatgttgcc aatctcccgc ataactgtat 5580  
 acataagtat tagcaaatct ttccatcaaa gtgaaccgt gacggggcta ctaattatgc 5640  
 tatgggaccg cgtataatg tacgaacga ctgaccagta aatcaccaca gtatcgaggt 5700

gcaacctggt gcaacaaggc gcagcaccgt cctgttccat tccatctttg taccataccc 5760  
 atttctcttg agatagatat cctgtgggtc ttgagtttag agtacaaca gctcggaagt 5820  
 tcattcatgg ataaagtctt tcaatctccg ttgacgcag gagcggcgt ccccggtgat 5880  
 cattgtatca tcttgactaa ttctcgga aggtgtaaaa ggaggtgtat ataaggacgg 5940  
 cagaagaggg cagaagctgg gcagaagtga catagaaaat ggcgtccaa atgggcgaaa 6000  
 tcaggaatta atctgtgtac attggaagat aagataagat catatgccat aagatcaaca 6060  
 ttatttgact ccgatctgat tgattgaaa acctcagaac tgcaaaagag cctctttttt 6120  
 ccagcactct tatcttcata tacagtctg cctcccccc ctcttacagc gaagttcccc 6180  
 accatgaacg acaaaatttt ggaggatacg agegatcctg gcttaccgac cactattggt 6240  
 ccccatactg cagattttga tgctcttcc ttggtgatc ggagtttagta 6290

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>  
 <221> Degenerate  
 <222> (11)  
 <223> "n" is a, t, c or g

<220>  
 <221> Degenerate  
 <222> (14)  
 <223> "n" is a, t, c or g

<400> 6  
 tycarathgg nggnathcay gg

22

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> Degenerate  
<222> (2)  
<223> "n" is a, t, c or g

<220>  
<221> Degenerate  
<222> (8)  
<223> "n" is a, t, c or g

<220>  
<221> Degenerate  
<222> (14)  
<223> "n" is a, t, c or g

<400> 7  
rnckrtcnac ytgngcrtgr tg 22

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8  
gcgcaggaaa taagccagta gacac 25

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9  
gcgtggtgca taaagaaaat 20

<210> 10  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10  
attccaagcc tgtattccct cctatcg 27

<210> 11  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11  
ctctgtgaaa acaaatcggg gtgtgggg 28

<210> 12  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12  
ggaattcgaa tgaactatcg cgataaataa ataatgt 37

<210> 13  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13  
agcttctgcc ctcttctgcc gtcctta 27

【0097】

【配列表フリーテキスト】

【配列番号6】 プライマー。第11塩基及び第14塩基のnは、a、t、c又はgである。

【配列番号7】 プライマー。第2塩基、第8塩基及び第14塩基のnは、a、t、c又はgである。

【配列番号8～13】 プライマー。

【0098】

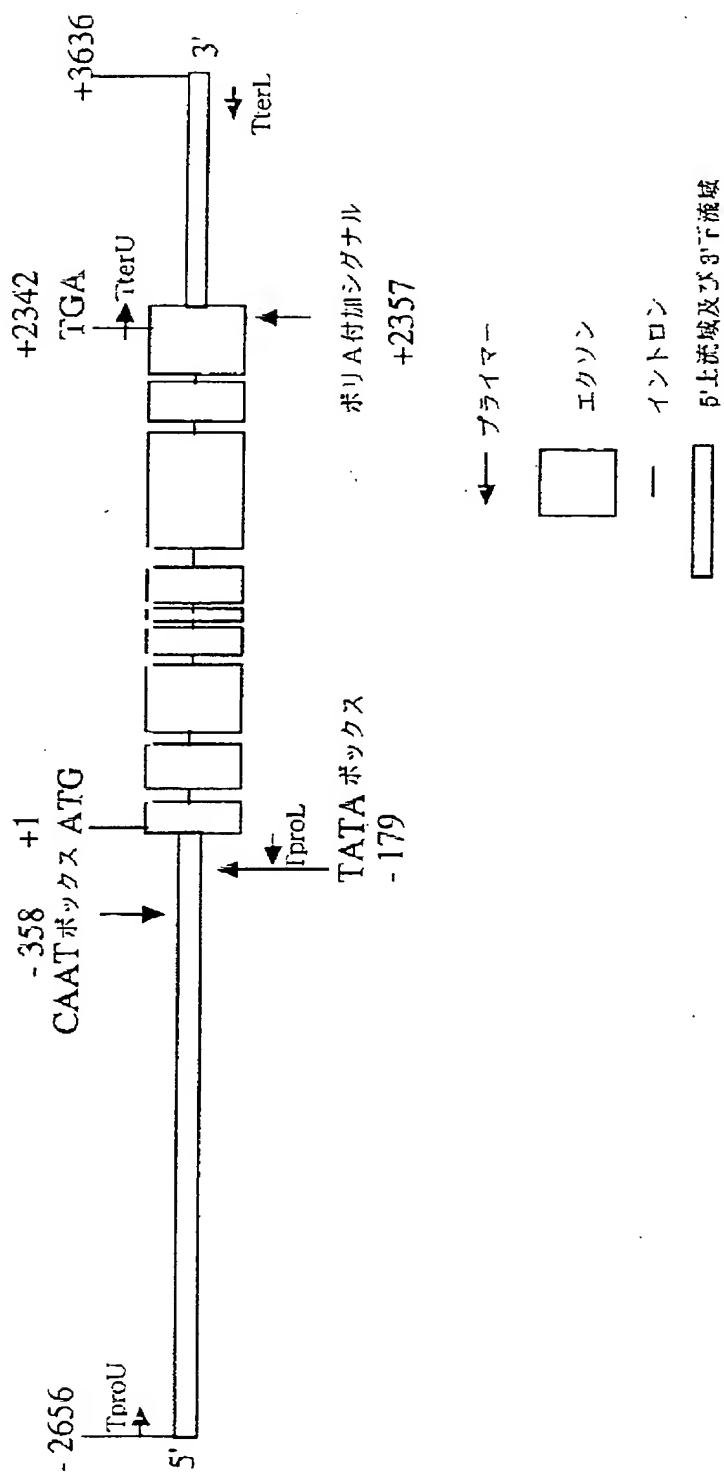
【図面の簡単な説明】

【図1】シイタケチロシナーゼ遺伝子の構造を表わす模式図である。

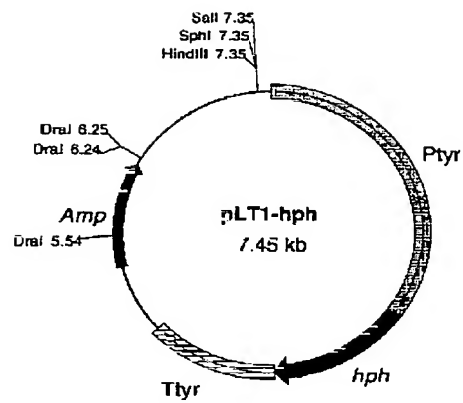
【図2】本発明の遺伝子発現ベクターpLT-hphの構造を表わす模式図である。



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	A
(72) 発明者 大川 久美子 岩手県北上市町分 1-284-1 プレステ ージ I I 205号		(72) 発明者 江井 仁 岩手県北上市新穀町 1 丁目 6 番地 27 F ターム (参考) 2B030 AA05 AD08 CA17 CA19 CB03 4B024 AA20 BA02 BA03 BA08 CA04 DA11 EA04 FA02 FA07 GA14 GA19 HA01 HA14 4B065 AA26Y AA71X AB01 AC14 BA03 BA25 CA24 CA28	
(72) 発明者 神田 勝弘 岩手県盛岡市西青山 1-7 青山アパート 1-201号			
(72) 発明者 八重樫 香 岩手県宮古市宮町 3-6-16 ディアス宮 町 A-201			